

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-116499

(43)Date of publication of application : 27.04.1999

---

(51)Int.Cl.

A61K 38/28

A61K 9/51

A61K 38/23

A61K 47/30

---

(21)Application number : 09-283473

(71)Applicant : ASAHI CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 16.10.1997

(72)Inventor : YAMAMOTO HIROMITSU

TAKEUCHI HIROFUMI

KAWASHIMA YOSHIKI

KUNO YOSHIO

---

(54) NANOSPHERE FOR ORAL ADMINISTRATION CONTAINING BIOACTIVE PEPTIDE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject useful nanosphere which is excellent in the absorption from digestive tracts and possesses the sustainability by coating a nucleus part of a biodegradable polymer with a specific polymer.

SOLUTION: This nanosphere is obtained by coating (B) a nucleus part of a biodegradable polymer (suitably a lactic acid-glycolic acid copolymer or a polylactic acid) containing (A) a bioactive peptide (suitably calcitonins or insulin) with (C) a digestive tract mucosal adhesive polymer (suitably chitosan, a polyacrylic acid and a chitosan derivative), preferably (D) a polyvinyl alcohol. For example, in order to prepare the objective nanosphere, the solvent-in-oil diffusion method or the like which is carried out by slowly dropping an inner phase B (it is obtained by dissolving the components A and B into a second organic solvent and a second emulsifying agent) into an outer phase A (it is obtained by mixing a first organic solvent with a first emulsifying agent and dissolving it) may be used.

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-116499

(43)公開日 平成11年(1999)4月27日

(51)Int.Cl.<sup>8</sup>

識別記号

F I

A 6 1 K 38/28

A 6 1 K 37/26

9/51

9/51

38/23

47/30

B

47/30

37/30

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 10 頁)

(21)出願番号

特願平9-283473

(22)出願日

平成9年(1997)10月16日

(71)出願人

000000033

旭化成工業株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

(72)発明者

山本 浩充

岐阜県岐阜市八代3丁目19番13号

(72)発明者

竹内 洋文

岐阜県岐阜市栗野西7丁目91番地

(72)発明者

川島 嘉明

岐阜県岐阜市下土居185番地

(72)発明者

久野 由雄

岐阜県岐阜市岩崎683番地の2

(54)【発明の名称】 生理活性ペプチドを含有した経口投与用ナノスフェア

(57)【要約】

【課題】 経口投与用ナノスフェアであり、生理活性ペプチドの吸収性の改善および吸収の持続化により、医療上有用な効果を有する生理活性ペプチド含有経口投与用ナノスフェアを提供する。

【解決手段】 生理活性ペプチドを含有した生体内分解性ポリマーの核部分を消化管粘膜付着性高分子、必要に応じてポリビニルアルコールとともに被覆した経口投与用ナノスフェア。

【効果】 生理活性ペプチドの良好な吸収率と吸収の持続性を持った生理活性ペプチドの経口投与用製剤が提供でき、このことにより、これまで注射などでしか投与できなかった生理活性ペプチドが経口でも投与可能となり、患者のQOLの改善につながる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 生理活性ペプチドを含有した生体内分解性ポリマーの核部分を消化管粘膜付着性高分子で被覆した経口投与用ナノスフェア。

【請求項2】 消化管粘膜付着性高分子が、キトサン、ポリアクリル酸およびキトサン誘導体からなる群より選ばれた1種または2種以上である請求項1記載の経口投与用ナノスフェア。

【請求項3】 生理活性ペプチドが、カルシトニン類またはインスリンである請求項1記載の経口投与用ナノスフェア。

【請求項4】 生体内分解性ポリマーが、乳酸・グリコール酸共重合体またはポリ乳酸である請求項1記載の経口投与用ナノスフェア。

【請求項5】 生理活性ペプチドを含有した生体内分解性ポリマーの核部分を消化管粘膜付着性高分子及びポリビニルアルコールで被覆した経口投与用ナノスフェア。

【請求項6】 消化管粘膜付着性高分子が、キトサン、ポリアクリル酸およびキトサン誘導体からなる群より選ばれた1種または2種以上である請求項5記載の経口投与用ナノスフェア。

【請求項7】 生理活性ペプチドが、カルシトニン類またはインスリンである請求項5記載の経口投与用ナノスフェア。

【請求項8】 生体内分解性ポリマーが、乳酸・グリコール酸共重合体またはポリ乳酸である請求項5記載の経口投与用ナノスフェア。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、生理活性ペプチドを含有した生体内分解性ポリマーの核部分を消化管粘膜付着性の高分子で被覆した、経口投与用ナノスフェアに関するものであり、生理活性ペプチドの吸収性の改善および吸収の持続化により、医療上有用な効果を有する生理活性ペプチド含有経口投与用ナノスフェアを提供する技術に関する。

## 【0002】

【従来の技術】医薬の研究の進歩、また遺伝子工学の進歩により、カルシトニン類やインスリンをはじめとする生理活性ペプチドの医薬品としての有用性が示され、また、医療の場での使用頻度が高まって来ている。しかしながら、一般にペプチドは水溶性が高く、分子量が大きいため消化管からの吸収がきわめて低く、また、消化管内での酵素による加水分解を受けやすいために、経口投与によるバイオアベイラビリティはきわめて低い。

【0003】このため、カルシトニン類やインスリンをはじめとするペプチド性医薬品は、現在臨床ではほとんどの場合、注射剤として使用されている。しかし、注射は投与時に疼痛が伴い、また、これらペプチド性医薬品は一般に血中半減期が短いために頻回投与が必要である

こと、さらには、多くの場合入院や通院が必要であることが、患者のQOL（生活の質）を低下させている。このため、ペプチド性医薬品の投与経路の変更として、経口投与製剤、経鼻投与製剤、坐剤、経腔剤、経肺投与製剤、点眼剤、およびイオントフォーシスなどの経皮投与製剤、などを目指した研究が数多くなされている。

【0004】特に、投薬がもっとも簡便で一般的な、経口投与製剤化を目指し、多くの研究がなされている。

〔Int. J. Pharm., vol. 86, 239-246, (1992)〕、Pharm. Res., vol. 13, No. 12, 1838-1845, (1996)〕。しかしながら、経口投与においては何れも十分な吸収性を得られるには至っておらず、また、持続化もなされていない。

【0005】また、近年医薬品の製剤技術に関する研究領域において、生体内分解性高分子を基剤としたコントロールリリース製剤などの研究が数多くなされている。そのうち、すでにかなりの技術が積み重ねられているものに、マイクロカプセル、マイクロスフェアと称されるものがあり、注射剤や経口剤などでの利用が試みられている。

【0006】これらのなかには、薬物として、黄体形成ホルモン放出ホルモン（LH-RH）の誘導体である酢酸リュープロレリンを含み、高分子として乳酸・グリコール酸共重合体を用いたもので〔Chem. Pharm. Bull., vol. 36, 1095-1103, (1988)〕、既に医薬品として利用されているものもある。また最近、ナノカプセル、ナノスフェアと称されるものについての研究も進められている。通常のマイクロカプセル、マイクロスフェアの粒径は、約5〜500マイクロメートルであるのに対し、ナノカプセル、ナノスフェアは粒径が、通常約1000ナノメートル以下のものであり、下限としては50ナノメートル程度であるが特に下限を限定するものではない。

【0007】各種のマイクロカプセル、マイクロスフェアの製造法については、すでに数多くの開示があり〔特開平1-216918号公報〕、また、ナノスフェア、ナノカプセルの製造法についても、既にいくつかの技術が開示されている〔特開平5-58882号公報〕。一方、天然の高分子であるキチンや、その脱エステル化体であるキトサンについて、近年幅広い分野でその利用についての検討がなされており、医薬の分野においても、創傷の治癒に関する効果や、製剤の基剤としての利用について、研究がなされている。

## 【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は生理活性ペプチドの経口投与用製剤として消化管からの吸収性が良く、また持続性を付与した、有用な生理活性ペプチドの経口投与用ナノスフェアを提供しようとするものである。

## 【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らはこれまで、生体内分解性ポリマーである乳酸・グリコール酸共重合体やポリ乳酸などを用いたナノスフェアについて、その製造法や医薬品としての有用性について研究を重ねてきている。また一方で、天然の高分子であり、いくつかの興味深い性質を有するキトサンについて、製剤分野での利用について、種々検討を重ねてきている。

【0010】今回、生理活性ペプチドであるエルカトニン含有し、生体内分解性ポリマーである乳酸・グリコール酸共重合体からなるナノスフェアを核部分とし、これに消化管粘膜付着性高分子の一つであるキトサンで被覆することにより、経口投与時の消化管からの吸収が向上し、また持続化した経口投与用ナノスフェアが得られることを見だし、さらに消化管粘膜付着性高分子とともにポリビニルアルコールで被覆することにより好適な経口投与用ナノスフェアが得られることを見出した。

【0011】本発明は上記の知見に基づいて完成されたもので、生理活性ペプチドを含有した生体内分解性ポリマーの核部分を消化管粘膜付着性高分子で被覆した経口投与用ナノスフェア、生理活性ペプチドを含有した生体内分解性ポリマーの核部分を消化管粘膜付着性高分子及びポリビニルアルコールで被覆した経口投与用ナノスフェアを提供するものである。

【0012】本発明に用いられる生体内分解性ポリマーとは、生体内で分解・消失する性質を有する高分子であり、生理活性を持たないポリマーであればどのようなものであってもよい。このようなポリマーとしては、例えば、乳酸、リンゴ酸、ヒドロキシ酢酸、グリコール酸などのホモポリマー（重合体）、並びにこれらのコポリマー（共重合体）が挙げられる。好ましくは、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、乳酸・グリコール酸共重合体であり、さらに好ましくは、乳酸・グリコール酸共重合体である。

【0013】ポリ乳酸としては、分子量約2000～20000、好ましくは2000～10000、さらに好ましくは5000～50000のものが挙げられる。ポリグリコール酸としては、分子量約2000～20000、好ましくは10000～150000、さらに好ましくは30000～100000のものが挙げられる。乳酸・グリコール酸共重合体としては、乳酸とグリコール酸を約0.01:1～1:0.01、好ましくは1:5～10:1、さらに好ましくは1:1～6:1の比率で含む、分子量約2000～200000、好ましくは5000～150000、さらに好ましくは10000～100000の共重合体である。これらはたとえば、乳酸とグリコール酸をイオン交換樹脂を触媒として弱い減圧下に加熱し、縮合重合させることにより製造される。また適当な市販品も存在する。本発明においては、これらを単独で用いてもよく、また、数種類を混

合して用いてもよい。

【0014】本発明にいう消化管粘膜付着性高分子とは、ヒトを含む哺乳動物の胃、小腸、大腸などの消化管のいずれかの部分の内腔側の粘膜に付着する性質を有する高分子であればよく、この付着性は、例えばラットの腸管を用いた実験などにより容易に確認することができ、例えばキトサン、ポリアクリル酸およびキトサン誘導体からなる群より選ばれた1種または2種以上のものが挙げられる。好ましくは、キトサンまたはポリアクリル酸であり、さらに好ましくはキトサンである。

【0015】キトサンは、生体適合性に優れ、生体内分解性を有する天然高分子であり、その面からも好適である。ここでいうキトサンとは、完全に脱エステル化されたキチンを示すものではなく、一部もしくは全てが脱エステル化されたキチンを示す。本発明に用いられるポリアクリル酸としては、分子量約1000～10000のものが挙げられ、好ましくは2000～5000である。

【0016】本発明に用いられるキトサンとしては、分子量約5000～200000のものが挙げられ、20000～100000が好ましく、30000～70000がさらに好ましい。また、その脱エステル化度は約50～100%のものが挙げられ、70～100%が好ましく、80%～100%がさらに好ましい。キトサンは、通常、精製キチンを原料として、30～60%の強アルカリ溶液中で、加熱加水分解することによって調製することができる。また既に適当な市販品も存在する。

【0017】キトサンの誘導体としては、カルボキシメチル化キトサン、カルボキシエチル化キトサン、ヒドロキシエチル化キトサン、ジヒドロキシプロピル化キトサンなどが挙げられる。また、本発明に用いられるポリビニルアルコールとしては、重合度約100～5000のものが挙げられ、好ましくは100～3000、さらに好ましくは200～2000のものが挙げられる。また、そのけん化度は、約70～100のものが挙げられ、好ましくは75～95、さらに好ましくは75～90のものが挙げられる。このようなポリビニルアルコールは、ポリ酢酸ビニルの部分もしくは完全加水分解により製造することもできるが、適当な市販品も存在する。

【0018】さらに、本発明に用いられる生理活性ペプチドとしては、3個以上のアミノ酸から構成される生理活性を持つペプチドが用いられる。その分子量としては約300～10000のものが好ましい対象として挙げられる。例えば、カルシトニン類、インスリン、副甲状腺ホルモン（PTH）類、カルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）、アンギオテンシンII、バソプレシン、酢酸デスモプレシン、酢酸ブセリン、酢酸ゴセリン、酢酸ナファレリン、酢酸リュープアロレリン、ソマトスタチン、グルカゴン、オキシトシン、セクレチン、黄体形成ホルモン放出ホルモン（LH-RH）、副腎皮

質刺激ホルモン（ACTH）、甲状腺ホルモン放出ホルモン（TRH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、心房ナトリウム利尿ペプチド（ANP）およびこれらの合成品および半合成品を含む誘導体などが挙げられる。このうち、カルシトニン類としては、ウナギカルシトニン、サケカルシトニン、ヒトカルシトニン、ブタカルシトニン、ニワトリカルシトニンなどの天然型カルシトニンおよびASU<sup>1-7</sup> ウナギカルシトニン（エルカトニン）、ASU<sup>1-7</sup> ニワトリカルシトニンなどの半合成カルシトニンが挙げられる。また、インスリンとしては、ヒトインスリン、ブタインスリン、ウシインスリン、およびこれらの誘導体が挙げられる。さらに、副甲状腺ホルモン（PTH）類としては、ヒトPTH（1-84）、ヒトPTH（1-38）、ヒトPHT（1-34）およびこれらの誘導体などが挙げられる。好ましくは、カルシトニン類、インスリン及び副甲状腺ホルモン類であり、さらに好ましくはカルシトニン類であり、特に好ましくはエルカトニンである。

【0019】本発明で用いられるナノスフェアの大きさは、平均粒子径として、2000ナノメートル以下であり、好ましくは1000ナノメートル以下であり、さらに好ましくは800ナノメートル以下であり、下限としては50ナノメートル程度であるが、特に下限は限定されるものではない。消化管粘膜付着性高分子のコーティング量は、ナノスフェア全量の0.001～20%（W/W）であり、好ましくは0.005～5%（W/W）である。また、ポリビニルアルコールのコーティング量は、ナノスフェア全量の0.01～20%（W/W）であり、好ましくは0.1～10%（W/W）である。

【0020】本発明のナノスフェアは、生理活性ペプチドを含有する生体内分解性ポリマーのナノスフェアの核部分を公知の方法により調製し、これに消化管粘膜付着性高分子をコーティングしてもよく、核部分のナノスフェアの調製時に、同時に消化管粘膜付着性高分子でコーティングされるような方法により調製してもよい。本発明のナノスフェアの製造工程のうち、消化管粘膜付着性高分子によるコーティングを行う工程においては、凍結乾燥時のナノスフェアの凝集を抑制し、また凍結乾燥後の再分散性の優れたナノスフェアを得る目的から必要に応じポリビニルアルコールなどの高分子を併用してもよく、好ましくは消化管粘膜付着性高分子とポリビニルアルコールを併用して同時にコーティングした方がよい。

【0021】本発明のナノスフェアの基本的な調製法の例として、「油中溶媒拡散法」と「水中溶媒拡散法」の概略を以下に示すが、本発明はナノスフェアの調製法として、この2つの方法のみにとらわれるものではない。「油中溶媒拡散法」では、まず、脂肪酸グリセリドなどの脂質、n-ヘキサンなどの第1の有機溶媒、及び第1の乳化剤を混合し、溶解した外相＜A＞を調製する。一方、生体内分解性ポリマー、生理活性ペプチド、

及び第2の乳化剤を第2の有機溶媒に溶解した内相＜B＞を調製する。外相＜A＞中に攪拌下、内相＜B＞をペリスターポンプなどを用いて、ゆっくりと滴下する。次に、加温減圧下、数時間にわたり攪拌を続け、ナノスフェアを生成させる。得られたナノスフェアの懸濁液について、必要に応じ第1の有機溶媒を加えたのち、遠心分離を行い、上澄み液を除去する。さらに必要に応じ、粒子表面の脂質を除去するために第1の有機溶媒を加えて再懸濁し、遠心分離後、上澄み液を除去する操作を繰り返す。

【0022】得られたペレットを乾燥し、これを消化管粘膜付着性高分子、および必要に応じポリビニルアルコールを併せて溶解した水系溶液（水溶液、各種の緩衝液溶液）中に分散させる。その後、遠心分離、上澄み液を除去後、ペレットを水に再懸濁する。得られた懸濁液を凍結乾燥することにより、生理活性ペプチドを封入し、かつ消化管粘膜付着性高分子で、または消化管粘膜付着性高分子とポリビニルアルコールでコーティングしたナノスフェアを得ることができる。

【0023】外相＜A＞に用いる脂質とは、生体内分解性ポリマー及び生理活性ペプチドを溶かしにくい性質を持つ単純脂質であり、例としては、大豆油、ゴマ油、ヒマシ油、コーン油、綿実油などの植物油、脂肪酸グリセリドなどが挙げられ、これらの2種以上を混合して用いてもよい。また、これらの脂質の代わりに、流動パラフィンやシリコンオイルを用いてもよい。

【0024】第1の有機溶媒は、用いる脂質を溶かしやすく、且つ生体内分解性ポリマー及び生理活性ペプチドを溶かしにくい溶媒であり、例えばn-ヘキサン、n-ヘプタンなどである。外相＜A＞は、上記の脂質または第1の有機溶媒を単独で用いてもよいが、好ましくは、脂質と第1の有機溶媒を混合して用いた方がよく、さらに好ましくは、中鎖脂肪酸トリグリセリドとn-ヘキサンなどを混合して用いるのがよい。

【0025】内相＜B＞に用いる第2の有機溶媒は、生体内分解性ポリマーおよび生理活性ペプチドを溶かしやすく、第1の有機溶媒に溶け込む性質を持ち、且つ第1の有機溶媒より低沸点の有機溶媒である。溶媒の沸点としては、約120℃以下、好ましくは100℃以下、さらに好ましくは約30～80℃である。例としては、アセトン、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、アセチルアセトン、テトラヒドロフラン、ジオキサン等であり、またこれらの2種以上の混合溶媒であってもよい。

【0026】第1及び第2の乳化剤は、それぞれの溶媒に溶解するものの中から、適当なものを選ぶことができる。第1の乳化剤は、条件によっては無くてもよい。乳化剤の例としては、ステアリン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウムなどのアニオン性界面活性剤、ソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪

酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体などの非イオン性界面活性剤、レシチンなどが挙げられる。これらの乳化剤は2種以上を混合して用いてもよい。好ましくは、それぞれ非イオン性界面活性剤を用いるのがよい。

【0027】外相<A>と内相<B>の混合比率は、内相<B>1重量部当たり、外相<A>0.5~1000重量部、好ましくは1~100重量部である。また、生体内分解性ポリマーの内相<B>中の濃度は、ポリマーの種類や分子量、第2の有機溶媒の種類によって異なるが、通常0.01~50% (w/w)、好ましくは0.1~20% (w/w) である。また、生理活性ペプチドの生体内分解性ポリマーに対する割合は、ペプチドの種類や目的とする吸収量及び持続時間により異なるが、例えば、0.0005~50% (w/w)、好ましくは0.05~20% (w/w) である。また、消化管粘膜付着性高分子の水系溶液中の濃度は、高分子の種類や分子量によっても異なるが、通常0.005~1% (w/w) であり、キトサンの場合、好ましくは0.01~0.5% (w/w) であり、さらに好ましくは0.02~0.1% (w/w) である。また、ポリビニルアルコールの水系溶液中の濃度は、通常0.05~5% (w/w) であり、好ましくは0.3~3% (w/w) である。また、乳化剤の使用の際の濃度は、通常0.01~20% (w/w) であり、好ましくは0.05~10% (w/w) である。

【0028】攪拌は、通常マグネティックスターラーなど緩やかな条件で行うが、必要ならば高速ホモジナイザーなどを用いてもよい。また、調製したナノスフェアの単離は、上記に示したような凍結乾燥の他、超遠心分離や透析などにより行うことができる。また、上記に示した内相<B>に代えて、例えばW/O型エマルジョンを内相<B>として用いてナノスフェアを調製してもよい。即ち、生体内分解性ポリマーと乳化剤をクロロホルム、ジクロロメタン、ジクロロエタン、トリクロロエタンなどの揮発性有機溶媒に溶解し、これに、生理活性ペプチドを、例えば水溶液、各種緩衝液などの水系溶媒に溶解したものを加え、ホモジナイザーなどを用いてW/O型エマルジョンを調製し、これを上記の内相<B>として用いてもよい。

【0029】「水中溶媒拡散法」では、消化管粘膜付着性高分子、および必要に応じポリビニルアルコールを併せて溶解した水系溶液（水溶液、各種の緩衝液溶液）を外相<C>として調製する。一方、生体内分解性ポリマー及び生理活性ペプチドを有機溶媒に溶解した内相<D>を調製する。なお、内相<D>には、必要に応じて、適当な乳化剤を添加してもよい。外相<C>中に攪拌下、内相<D>をペリスターポンプなどを用いて、ゆっくりと滴下する。必要に応じ、加温減圧下、数時間にわたり攪拌を続け、ナノスフェアを生成させる。得られた

ナノスフェアの懸濁液を遠心分離し、上澄み液を除去、さらに必要に応じ洗浄操作を加えた後、得られたペレットを水に再懸濁させ、これを凍結乾燥することにより、生理活性ペプチドを封入し、かつ消化管粘膜付着性高分子で、または消化管粘膜付着性高分子とポリビニルアルコールでコーティングした、ナノスフェアを得ることができる。

【0030】内相<D>に用いる有機溶媒は、生体内分解性ポリマーおよび生理活性ペプチドを溶かしやすく、揮発性かつ水混和性の有機溶媒である。水に対する溶解度は約80%以上であり、90%以上が好ましく、完全混和性のものがさらに好ましい。溶媒の沸点は、約120℃以下であり、100℃以下が好ましく、約30~80℃がさらに好ましい。例としては、アセトン、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、アセチルアセトン、テトラヒドロフラン、ジオキサン等であり、またこれらの2種以上の混合溶媒であってもよい。

【0031】外相<C>と内相<D>の混合比率は、内相<D>1重量部当たり、外相<C>0.5~1000重量部、好ましくは1~100重量部である。また、生体内分解性ポリマーの内相<D>中の濃度は、ポリマーの種類や分子量、有機溶媒の種類によって異なるが、通常0.01~50% (w/w)、好ましくは0.1~20% (w/w) である。また、生理活性ペプチドの生体内分解性ポリマーに対する割合は、ペプチドの種類や目的とする吸収量及び持続時間により異なるが、例えば、0.0005~50% (w/w)、好ましくは0.05~20% (w/w) である。また、消化管粘膜付着性高分子の外相<C>中の濃度は、高分子の種類や分子量によっても異なるが、通常0.1~5% (w/w) であり、キトサンの場合、好ましくは0.1~2% (w/w) であり、さらに好ましくは0.2~0.6% (w/w) である。また、ポリビニルアルコールの外相<C>中の濃度は、通常0.5~5% (w/w) であり、好ましくは1~3% (w/w) である。

【0032】内相<D>に必要に応じて添加してもよい乳化剤の例としては、ステアリン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウムなどのアニオン性界面活性剤、ソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体などの非イオン性界面活性剤、レシチンなどが挙げられる。これらの乳化剤は2種以上を混合して用いてもよい。好ましくは、非イオン性界面活性剤を用いるのがよい。また、乳化剤の使用の際の濃度は、通常0.01~20% (w/w) であり、0.05~10% (w/w) が好ましい。

【0033】攪拌は、通常マグネティックスターラーなど緩やかな条件で行うが、必要ならば高速ホモジナイザーなどを用いてもよい。また、調製したナノスフェアの単

離は、上記に示したような凍結乾燥の他、超遠心分離や透析などにより行うことができる。本発明のナノスフェアは、その含有する生理活性ペプチドを薬効成分とした経口投与型の医薬品として利用できる。その際、本発明のナノスフェアのみで散剤として用いることもできるが、一般的に医薬品の製造に用いられている各種の添加剤を加えて、散剤、顆粒剤、カプセル剤、軟カプセル剤、錠剤、懸濁型のシロップ剤やドライシロップ剤、などに製剤化して用いてもよい。添加剤としては、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、安定化剤、pH調整剤などを必要に応じて用いることができ、また必要によっては腸溶性などのコーティング剤や徐放化剤を用いてもよい。

【0034】本発明によるナノスフェアの経口投与における、生理活性ペプチドの消化管からの吸収改善、及びまたは、吸収の持続化のメカニズムは以下のように推測される。但し本発明は、下記に示すメカニズムによって限定されるものではない。キトサンなどの消化管粘膜付着性高分子でナノスフェアをコーティングすることにより、ナノスフェアが消化管粘膜に付着しやすくなる。このため、ナノスフェアから溶出する生理活性ペプチドが、その吸収部位である消化管上皮細胞のごく近傍に高濃度で、かつ長時間にわたり存在することになり、吸収量が増大し、また吸収が持続化する。さらに別の要因としては、溶出した生理活性ペプチドの近傍にキトサンなどが存在し、これが生理活性ペプチドの、消化管内に存在するペプチド分解酵素による分解を阻害しているという可能性もある。

#### 【0035】

【発明の実施の形態】以下に、実施例、参考例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。更に実験例を挙げて、本発明製剤の効果を具体的に示す。なお、以下の実施例において、乳酸・グリコール酸共重合体はPLGAと略す。また、ポリ乳酸はPLAと略す。

#### 【0036】

##### 【実施例1】

(キトサンでコーティングしたエルカトニン封入PLGA(75:25)ナノスフェアの調製)ポリリシノール酸ヘキサグリセリル(Hexaglyn PR-15;日光ケミカルズ社製)を2%含有するトリ(カプリル・カプリン酸)グリセリル(トリエスターF810;日光ケミカルズ社製)60mlを調製し、さらにn-ヘキサン40mlを混合溶解し外相を調製した。次に、ソルビタンモノオレート(Span80;キシダ化学社製)100mg、PLGA(平均分子量20000、乳酸:グリコール酸重合比=75:25、和光純薬工業社製)100mg、エルカトニン(旭化成工業社製)2mgをアセトン3mlとメタノール2mlの混合溶媒中に溶解した溶液を外相溶液の攪拌下、ペリスターポンプを用いて

2ml/minの速度で滴下した。

【0037】ついで35℃にて減圧下3時間攪拌を続け、得られた懸濁液にn-ヘキサン20mlを加え、遠心操作(20000rpm、4℃、10分間)を行った。遠心操作後、上清を除去し、n-ヘキサンを加えて再懸濁させ、再度遠心操作を行った。遠心操作後、上清を除去し、沈殿物を乾燥し、これを1%ポリビニルアルコール(PVA-403、クラレ社製)の水溶液20mlと1%キトサン(平均分子量50000、板角社製)溶液(溶媒:0.05M酢酸緩衝液、pH4.4)1mlを混合した溶液中に分散させた。分散後、遠心操作を行い、上清を除去した後、沈殿物を精製水に再懸濁させた。得られた懸濁液を凍結乾燥し、キトサンでコーティングしたエルカトニン封入PLGA(75:25)ナノスフェア粉末89.9mg(エルカトニン含有量1.46mg)を得た。

#### 【0038】

##### 【実施例2】

(キトサンでコーティングしたエルカトニン封入PLGA(50:50)ナノスフェアの調製)実施例1において、PLGA(平均分子量20000、乳酸:グリコール酸重合比=75:25、和光純薬工業社製)の代わりにPLGA(平均分子量20000、乳酸:グリコール酸重合比=50:50、和光純薬工業社製)を用いた以外は同様にして、キトサンでコーティングしたエルカトニン封入PLGA(50:50)ナノスフェア粉末90.1mg(エルカトニン含有量1.52mg)を得た。

#### 【0039】

##### 【実施例3】

(キトサンでコーティングしたエルカトニン封入PLAナノスフェアの調製)実施例1において、PLGA(平均分子量20000、乳酸:グリコール酸重合比=75:25、和光純薬工業社製)の代わりにPLA(平均分子量20000、和光純薬工業社製)を用いた以外は同様にして、キトサンでコーティングしたエルカトニン封入PLAナノスフェア粉末88.3mg(エルカトニン含有量1.07mg)を得た。

#### 【0040】

##### 【実施例4】

(キトサンでコーティングしたインスリン封入PLGA(75:25)ナノスフェアの調製)ウシインスリン(Sigma社製)1mgを0.01M塩酸0.1mlと0.01M酢酸緩衝液(pH4.4)0.1mlを混合した溶液に溶解し、これをPLGA(平均分子量20000、乳酸:グリコール酸重合比=75:25、和光純薬工業社製)100mgとソルビタンモノオレート(Span80;キシダ化学社製)100mgを溶解したジクロロメタン溶液15ml中に加え、ホモジナイザーで3分間攪拌し、内相溶液となるエマルジョンを調製

した。

【0041】一方、ポリリシノール酸ヘキサグリセリル (Hexaglyn PR-15; 日光ケミカルズ社製) を2%含有するトリ (カプリル・カプリン酸) グリセリル (トリエスターF810; 日光ケミカルズ社製) 30ml を調製し、さらにn-ヘキサン20ml を混合溶解し外相溶液を調製した。上記の内相溶液を外相溶液に攪拌下、ペリスターポンプを用いて4ml/min の速度で滴下した。ついで35℃にて減圧下3時間攪拌を続け、得られた懸濁液にn-ヘキサン20ml を加え、遠心操作 (20000rpm、4℃、10分間) を行った。遠心操作後、上清を除去し、n-ヘキサンを加えて再懸濁させ、再度遠心操作を行った。遠心操作後、上清を除去し、沈殿物を乾燥し、これを1%ポリビニルアルコール (PVA-403、クラレ社製) の水溶液20ml と1%キトサン (平均分子量50000、板角社製) 溶液 (溶媒: 0.05M酢酸緩衝液、pH4.4) 1ml を混合した溶液中に分散させた。分散後、遠心操作を行い、上清を除去した後、沈殿物を精製水に再懸濁させた。得られた懸濁液を凍結乾燥し、キトサンでコーティングしたインスリン封入PLGA (75:25) ナノスフェア粉末77.5mg (インスリン含有量0.415mg) を得た。

【0042】

【参考例1】

(エルカトニンを封入したPLGA (75:25) ナノスフェアの調製) 実施例1において、キトサンを除いた以外同様にして、エルカトニン封入PLGA (75:25) ナノスフェア粉末79.9mg (エルカトニン含有量1.38mg) を得た。

【0043】

【参考例2】

(FITC-PLGA (75:25) ナノスフェアの調製) PLGA (平均分子量20000、乳酸:グリコール酸重合比=75:25、和光純薬工業社製) にフルオレセインイソチオシアネート (以下FITCと略す) を結合させたFITC-PLGAを次の方法により合成した。PLGA800mgとFITC0.8mgをアセトン8mlに溶解した溶液を還流下3時間反応させた。その後、エタノール30mlを加え、20000rpm、10分間遠心分離した。上澄みを除去し、沈澱物を3mlのアセトンで溶解し、30mlのエタノールを加えてFITC-PLGAを析出させ、20000rpm、10分間遠心分離した。この操作を4回繰り返し、最終的に得られた沈澱物を6mlのアセトンで溶解した後20mlの精製水を加え、減圧下35℃で2時間攪拌した。この懸濁液を凍結乾燥してFITC-PLGAを得た。

【0044】ポリマーとしてポリビニルアルコール (PVA-403、クラレ社製) 1gを使用し、蒸留水50mlに溶解した溶液を外相とし、この外相を400rpm

で攪拌下、FITC-PLGA200mgをアセトン3mlとメタノール2mlの混合溶媒中に溶解した溶液をペリスターポンプを用いて2ml/minの速度で滴下した。得られた懸濁液中のポリマーを取り除く操作として、懸濁液を遠心 (20000rpm、10min) し、沈澱物を精製水により洗浄した。さらに、ポリマーを取り除く操作を2回繰り返した。最終的に得られた懸濁液を凍結乾燥し、FITC-PLGA (75:25) ナノスフェア粉末183.8mgを得た。

【0045】

【参考例3】

(キトサンでコーティングしたFITC-PLGA (75:25) ナノスフェアの調製) 参考例2の外相中のポリマーとして、ポリビニルアルコール (PVA-403、クラレ社製) 1gとキトサン (平均分子量50000、板角社製) 0.5gを併せて用い、それらの溶解液として精製水の代わりに0.05M酢酸緩衝液 (pH4.4) を用いた以外、同様にして、キトサンでコーティングしたFITC-PLGA (75:25) ナノスフェア粉末167.0mgを得た。

【0046】

【参考例4】

(ポリアクリル酸でコーティングしたFITC-PLGA (75:25) ナノスフェアの調製) 参考例2の外相中のポリマーとしてポリビニルアルコール (PVA-403、クラレ社製) 1gとポリアクリル酸 (平均分子量2000、Aldrich社製) 0.5gを併せて用いた以外、同様にして、ポリアクリル酸でコーティングしたFITC-PLGA (75:25) ナノスフェア粉末181.2mgを得た。

【0047】

【参考例5】

(アルギン酸ナトリウムでコーティングしたFITC-PLGA (75:25) ナノスフェアの調製) 参考例2の外相中のポリマーとしてポリビニルアルコール (PVA-403、クラレ社製) 1gとポリアルギン酸ナトリウム (平均分子量228000、紀文フードケミファ社製) 0.25gを併せて用いた以外、同様にして、アルギン酸ナトリウムでコーティングしたFITC-PLGA (75:25) ナノスフェア粉末138mgを得た。

【0048】

【試験例1】

(ナノスフェアの粒子径の測定) 実施例1、実施例2、実施例3及び参考例1で調製したナノスフェア粉末を精製水中に再懸濁させて、動的光散乱法 (LPA3100、大塚電子社製) により粒子径を測定した。また、実施例1で調製したナノスフェアを走査型電子顕微鏡により観察した。

【0049】動的光散乱法により測定した重量平均粒子径を下記表1に示した。表1に結果を示した通り、実施例



1、実施例2、実施例3及び参考例1で調製したナノスフェアの重量平均粒子径は、500nm～700nmであった。また、電子顕微鏡で観察したところ、実施例1のナノスフェアは、球状であり、1000nm以下の粒子径であった。

【0050】表1 動的光散乱法により測定したナノスフェアの重量平均粒子径

【0051】

【表1】

重量平均粒子径 (nm)			
実施例 1	実施例 2	実施例 3	参考例 1
658.4	688.8	501.1	522.9

【0052】

【試験例2】

(ナノスフェアのゼータ電位の測定) 実施例1及び参考例1で調製したナノスフェアを蒸留水に懸濁させた後、溶媒(0.1Mの塩酸と0.1Mの水酸化カリウム水溶液を混合して調整した各pHの溶液)に分散させ、ナノスフェア粒子表面のゼータ電位をゼータ電位計(Zetamaster, Malvern Instruments 社製)により測定した。

【0053】結果は図1に示した通り、参考例1のナノスフェアに比較して、実施例1のナノスフェアは、ゼータ電位が酸性領域で正の値を示した。このことは実施例1のナノスフェア表面が酸性領域で正の電荷を持つキトサンによってコーティングされていることを示している。

【0054】

【試験例3】

(ナノスフェアの粘膜付着性評価) 参考例2、参考例3、参考例4及び参考例5で調製したFITC-PLGANANOスフェアを生理食塩水中に分散させて、常法により摘出したラット反転腸管(十二指腸、空腸、回腸)に一定時間浸した。その後、腸管に付着したFITC-PLGANANOスフェアを抽出し、ナノスフェアの粘膜への付着量を蛍光光度計を用いて測定した。ナノスフェア付着量と仕込んだナノスフェア量から付着率を求め、粘膜付着性の指標とした。

【0055】結果は図2に示した通り、参考例2に比較して、参考例5のアルギン酸ナトリウムをコーティングしたナノスフェアは、腸管粘膜との付着性に大きな違いは認められなかった。一方、参考例3及び参考例4のキトサン及びポリアクリル酸でコーティングしたナノスフェアは、参考例2に比較して、粘膜付着性が増加した。特に、参考例3のキトサンでコーティングしたナノスフェアは、最も高い粘膜付着性を示した。キトサンをコーティングしたナノスフェアが強い粘膜付着性を示した理由は、ナノスフェアの表面電位がキトサンの持つアミノ基により正に荷電しており、負に荷電している腸管粘膜との間に電気的相互作用が働いたためではないかと推察す

るが、それ以外の要因として粘膜成分との絡み合いなども考えられる。実際に、参考例3のキトサンの代わりに分子量1500のキトサンオリゴ糖を用いたナノスフェアでは、参考例3で調製したナノスフェアが示するような粘膜付着性は得られない。

【0056】

【試験例4】

(エルカトニン封入ナノスフェアの経口吸収性試験) Wistar系雄性ラット(9週令、180～210g)を使用し、実施例1及び参考例1で調製したナノスフェアを生理食塩水で溶解した溶液、また、対照としてエルカトニンを生理食塩水で溶解した溶液を500IU/Kgの投与量で各3匹に経口投与した。投与後、経時的にラット頸静脈から採血し、カルシウムC-テストワコー(和光純薬工業社製)にて血漿中カルシウム濃度を測定した。投与5分前の血漿中カルシウム濃度を100としてカルシウム低下率を算出した。

【0057】結果は図3に示した通りである。エルカトニン溶液投与群及び参考例1投与群に比較して、実施例1投与群は、投与8時間後76%までカルシウム濃度が低下し、強い血漿中カルシウム低下作用を示した。また、投与後36時間においても有意に血漿中カルシウム低下作用が持続した。すなわち、キトサンをコーティングしたナノスフェアが消化管粘膜上に付着し、消化管内移動速度が遅延したためと推測された。これらの結果から、本発明のキトサンをコーティングしたエルカトニン含有ナノスフェア製剤は、経口投与で消化管からエルカトニンの吸収性が改善され、かつ、持続性を有することを示している。

【0058】

【発明の効果】本発明により、生理活性ペプチドの良好な吸収率と吸収の持続性を持った、生理活性ペプチド含有ナノスフェアが提供でき、さらには生理活性ペプチドの経口投与用製剤が提供できる。このことにより、これまで注射などでしか投与できなかった生理活性ペプチドが経口でも投与可能となり、患者のQOLの改善につながる。

【図面の簡単な説明】

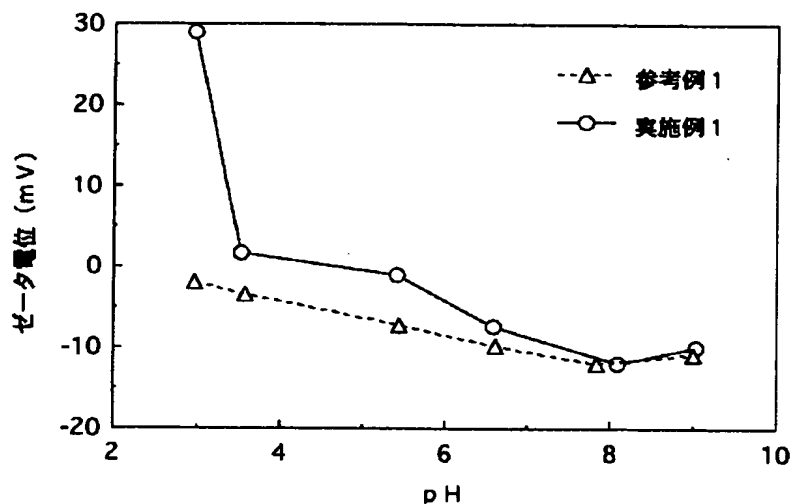
【図1】図1は、ナノスフェアのゼータ電位のpHプロファイルを示すものである。

【図2】図2は、各種ポリマーでコーティングしたナノ

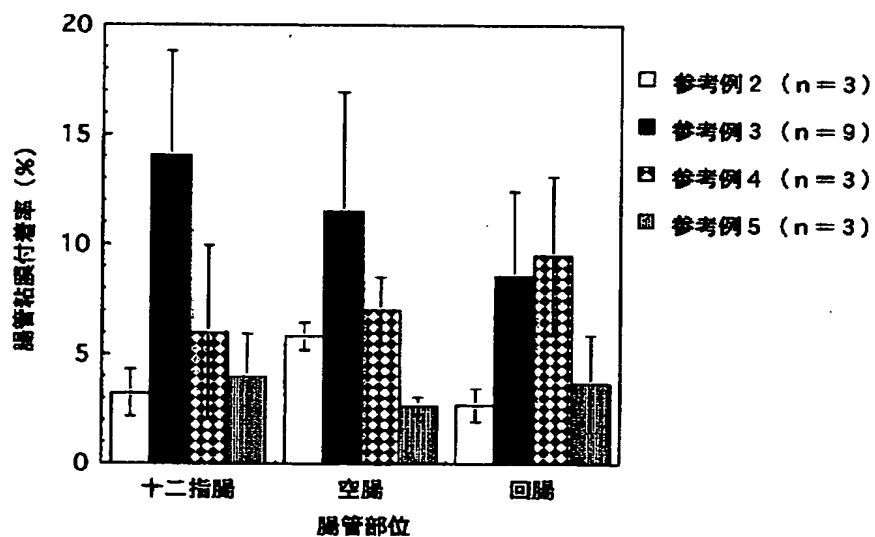
スフェアの腸管粘膜附着性を示すものである。

【図3】図3は、エルカトニン封入ナノスフェアの経口投与後の血漿中カルシウム低下のプロファイルを示すものである。

【図1】



【図2】



【図3】

